

بررسی مولکولی مقاومت به نالیدیکسیک اسید در E.coli ایزوله شده در بیماران با عفونت ادراری مراجعه کننده به بیمارستان بقیه... (عج)

خانعلی نقوی^۱، M.Sc.، نعمت ا... جنیدی جعفری^{۱*}، M.D.، علی کریمی^۲، Ph.D.، رحیم سروری^۲، Ph.D.

اکبر خلیل پور^۲، M.Sc.، زهرا سفیری^۱، M.Sc.، منیژه مجیدفرد^۱، B.Sc.، رضا دلیلی^۱، B.Sc.

آدرس مکاتبه: *دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) - مرکز تحقیقات بهداشت نظامی، تهران_ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۸۵/۶/۲۸ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۸۵/۱۱/۱۵ تاریخ اعلام قبولی:

۸۵/۱۱/۱۷

خلاصه

مقدمه: خانواده انتروباکتریاسه گروه بزرگی از باکتری‌ها را شامل می‌شوند که به طور وسیع در طبیعت پراکنده هستند. این باکتری‌ها به دلیل کلونیزاسیون در روده به عنوان باکتری‌های انتریک یا روده‌ای معروفند. E.Coli شایع‌ترین علت ایجاد کننده عفونت‌های ادراری می‌باشد. هدف این مقاله بررسی وضعیت مقاومت دارویی به نالیدیکسیک اسید در E.coli های ایزوله شده در خصوص عفونت‌های ادراری می‌باشد.

مواد و روش کار: در این تحقیق نمونه ادرار بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه بالینی بیمارستان بقیه... (عج) طی ۵ ماه (بهمن ۱۳۸۳ تا خرداد ۱۳۸۴) کشت داده شد و آزمایشات افتراقی جهت تشخیص E.coli صورت گرفت. جهت بررسی مقاومت دارویی بر روی نمونه‌های مثبت E.coli اعم از حساس و غیرحساس واکنش PCR طی ۴ مرحله صورت گرفت. سپس MIC انجام شد و در نهایت عمل سکانسینگ صورت گرفت.

نتایج: در این مطالعه ۱۲۱ نمونه E.Coli جدا گردید. با استفاده از دیسک آنتی‌بیوگرام نالیدیکسیک اسید، تعداد ۵۵ نمونه (۴۵/۵ درصد) حساس، تعداد ۶۳ نمونه (۵۲ درصد) مقاوم و ۳ نمونه (۲/۵ درصد) مقاومت متوسط (Intermediate) داشتند. بر روی این ۱۲۱ نمونه PCR انجام گردید که بر این اساس تعداد ۵۵ نمونه (۴۵/۵ درصد) حساس، تعداد ۶۳ نمونه (۵۲ درصد) مقاوم و ۳ نمونه (۲/۵ درصد) مقاومت متوسط (Intermediate) داشتند. این نتایج با نتایج دیسک آنتی‌بیوگرام مشابهت داشت. در روش MIC (minimum inhibitory concentration) نیز نتایج، با دو روش قبل مطابقت داشت.

بحث: توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مقایسه آن با سایر مطالعات، نشان دهنده روند فزاینده مقاومت باکتری E.Coli به داروهای رایج می‌باشد. لذا توصیه می‌شود ضمن کنترل مصرف بی‌رویه و غیرضروری آنتی‌بیوتیک‌ها، قبل از شروع درمان، آنتی‌بیوگرام و در صورت امکان MIC و PCR جهت تعیین حساسیت میکروبی انجام گردد تا آنتی‌بیوتیک مناسب برای درمان بیماران انتخاب گردد.

واژگان کلیدی: اشرشیا کلی، عفونت مجاری ادراری، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، نالیدیکسیک اسید، PCR، آنتی‌بیوگرام، MIC.

۱- دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، مرکز تحقیقات بهداشت نظامی

۲- دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی

۳- دانشگاه امام حسین (ع)، پژوهشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی

مقدمه

باکتری E.coli یکی از اعضای مهم خانواده انتروباکتریاسه‌ها محسوب می‌شود. این باکتری شایعترین علت بعضی از عفونت‌های شایع باکتریایی مانند عفونت‌های سیستم ادراری، باکتری می و اسهال باکتریایی مسافران می‌باشد. در حالی که مکان اصلی کلونیزاسیون طبیعی انتروباکتریاسه‌ها در دستگاه گوارش است، شایعترین محل ایجاد عفونت توسط آنها در سیستم ادراری می‌باشد. با توجه به این که سیستم ادراری به طور طبیعی استریل و فاقد هر گونه باکتری است، ورود باکتری E.coli از طریق مجرای ادرار به قسمت‌های فوقانی سیستم ادراری (کلیه‌ها) غیرطبیعی بوده، موجب عفونت در سیستم ادراری می‌شود [۱].

مقاومت دارویی میکروب‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک از مشکلات جاری بیماری‌های عفونی در جهان محسوب می‌شود. در دهه ۱۹۷۰ و اوایل دهه ۱۹۸۰ باسیل‌های گرم منفی با مقاومت چندگانه، بزرگترین مشکل کنترل عفونت محسوب می‌شدند [۲]. مطالعات همه‌گیر شناختی نشان داده‌اند که شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در هر دهه، انعکاس فزایندهٔ عواقب استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در دههٔ قبل است [۳].

اکثر عفونت‌های سیستم ادراری توسط باسیل‌های گرم منفی هوازی به ویژه اشرشیا کلی ایجاد می‌شوند که هم به عنوان پاتوژن واقعی و هم به عنوان فرصت طلب در عفونت‌های روده‌ای عمل می‌کند. البته بعضی از کوکسی‌های گرم مثبت (مانند انتروکوک‌ها) نیز گاهی اوقات می‌توانند عفونت‌های ادراری ایجاد کنند [۴-۶]. آگاهی از الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در E.coli به عنوان مهمترین پاتوژن عفونت‌های دستگاه ادراری، اهمیت ویژه‌ای به خصوص در انتخاب درمان تجربی آنتی‌بیوتیکی دارد [۷]. کینولون‌ها آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیفی هستند که برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی مورد استفاده قرار می‌گیرند. متأسفانه مقاومت به این داروها رو به فزونی است. مهمترین مکانیسمی که منجر به بروز مقاومت به کینولون‌ها می‌شود، وجود موتاسیون‌های متعدد در ژن‌های کد کننده هدف کینولون‌ها می‌باشد که مهمترین آنها موتاسیون در کدون ۸۳ است.

موتاسیون کدون ۸۳ شایع‌ترین موتاسیونی است که در ایزوله‌های بالینی E.coli وجود داشته، منجر بروز مقاومت به نالیدیکسیک اسید می‌شود [۸].

مطالعه ساختار ژنتیکی E.coli می‌تواند راهگشای اصلی در جهت درمان عفونت‌های ناشی از این باکتریها باشد. به طوری که PCR روش بسیار مؤثر، سریع و اختصاصی جهت شناسایی بسیاری از عوامل بیماری‌زا و از جمله مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها محسوب می‌شود. تاکنون تحقیقات بسیاری در رابطه با استفاده از این تکنیک در شناسایی ژن‌های عامل مقاومت بر علیه اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها صورت گرفته است که در برخی از تحقیقات تنها ژن *gyrA* و در برخی دیگر علاوه بر این ژن، ژن‌های *gyrB* و *parC* مورد بررسی قرار گرفته است. هدف این مقاله بررسی وضعیت مقاومت دارویی به نالیدیکسیک اسید در E.coli‌های ایزوله شده از عفونت‌های ادراری می‌باشد.

مواد و روش کار

در این تحقیق کـروم آگار از شرکت Microbiology Chrome Agar تهیه شد. Simmons Citrate، UREA، TSI، MRVP، Agar، LIA و Blood Agar از شرکت Merck تهیه گردید. دیسک نالیدیکسیک اسید از شرکت پادتن و پودر آن از شرکت البرز دارو (قزوین) تهیه شد. کلیه مواد مورد استفاده در فرآیند PCR نیز از شرکت Fermentas تهیه شد. همچنین مواد مورد استفاده در تخلیص DNA ژنومیک و الکتروفورز از شرکت Roche تهیه گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده ادرار (ادرار میانه و صبحگاهی) پس از مخلوط کردن و با استفاده از لوپ دو میکرولیتری استاندارد (استریل) یا سمپلر بیست میکرولیتری، به صورت خطی در پلیت‌های حاوی محیط کروم آگار کشت داده و به مدت یک شبانه روز در شرایط هوازی ۳۷ درجه سانتی گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. پس از ۲۴ ساعت پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت و وجود 10^5 باکتری یا بیشتر در هر میلی لیتر از ادرار به عنوان عفونت ادراری مثبت در نظر گرفته شد. برای تشخیص باکتری E.coli از روش‌های

جدول ۱. مقایسه نتایج PCR در چهار جفت پرایمر با نتایج MIC و آنتی بیوگرام

تعداد نمونه	نتایج PCR				نتایج MIC (غلظت ۲۵ تا ۸۰۰) $\mu\text{gr/ml}$	حساسیت به دیسک آنتی بیوگرام نالیدیکسیک اسید
	P1 & P5	P1 & P4	P 3 & P1	P2& P1		
۴۳	-	-	-	+	۲۵	S
۳۳	-	+	+	+	۲۰۰	R
۱۱	-	-	-	-	۲۵	S
۷	+	-	+	-	۲۰۰	R
۳	+	-	-	-	۲۰۰	R
۱۲	-	+	+	-	۲۰۰	R
۳	-	+	+	+	۵۰	I
۴	+	-	-	+	۲۰۰	R
۳	+	-	+	+	۲۰۰	R
۱	-	+	-	-	۲۰۰	R
۱	-	-	+	+	۲۰	R
۱۲۱	جمع					



شکل ۱: بررسی محصولات PCR -A: پرایمرهای P1 به عنوان

Reverse و P2 به عنوان Forward

چاهک شماره ۱: نشانگر اندازه، ۱۰۰bp. چاهک شماره ۲ تا ۱۳: نمونه های ۲۶ تا ۳۷ با پرایمرهای P1,2. نمونه های ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۶ و ۳۷، منفی و بقیه موارد مثبت بود (باندی حدود ۴۵۰bp).

نمونه با جفت پرایمرهای P1,2، P1,3، P1,4 و P1,5 انجام گرفت که با توجه به این که پرایمرهای P3، P4 و P5 به روش Arms طراحی شده بود، نتیجه مثبت PCR با هر یک از پرایمرهای P1,3، P1,4 و P1,5 دلیل بر وجود مقاومت در نظر گرفته شد. پس از واکنش PCR بر روی نمونه ها عمل سکانسینگ صورت گرفت؛

استاندارد استفاده گردید، بدین ترتیب که با استفاده از آزمایش TSI، هیدرولیز اوره، حرکت، تولید اندول، تجزیه سیترات، لیزین دکرپوکسیلاز، ذوب ژلاتین، تولید H₂S، تخمیر قندهای مختلف و جلای فلزی در سطح محیط کشت باکتری مورد تأیید قرار گرفت. سپس با استفاده از دیسک های آنتی بیوگرام نمونه های مثبت E.coli اعم از حساس و مقاوم مشخص شدند.

جدول ۲: موتاسیون های موجود در نمونه E.coli مقاوم به نالیدیکسیک

تغییر اسید آمینه	کدون
TAT → TTT	۸۱
TTG → TCG	۸۵
GCA → GTA	۸۷
ATA → ACA	۹۷
CTA → CCA	۱۰۷

در مرحله بعد واکنش PCR برای هر یک از نمونه ها انجام گردید. واکنش PCR بر روی ۱۲۱ نمونه و طی چهار مرحله برای هر

های ۸۵، ۸۱، ۱۰۷، ۹۷، ۸۷ مشاهده شد که یکی از موتاسیون‌ها (۸۷) جزء موتاسیون‌های اصلی مقاومت به نالیدیکسیک اسید می‌باشد. این نتایج در جدول ۲ آمده است.

بحث

مقاومت دارویی میکروب‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک از مشکلات جاری بیماران عفونی در جهان محسوب می‌شود که روند فزاینده‌ای دارد. در این میان افزایش رو به رشد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین عوامل باکتریایی ایجاد کننده عفونت‌های ادراری به لحاظ شیوع قابل توجه این عفونت‌ها در جامعه، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از این رو مطالعات متعددی در زمینه تعیین مقاومت دارویی میکروب‌ها در عفونت‌های ادراری انجام شده است. در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۸۱ در گرگان به منظور تعیین فراوانی نسبی عوامل مولد عفونت ادراری و نیز الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیک آنها بر روی ۲۰۰ بیمار انجام شده است مشخص گردید که فراوانی نسبی مولد عفونت در زنان (۸۰/۵٪) بیشتر از مردان (۱۹/۵٪) و بیشترین سن ابتلا ۳۰-۱۵ سالگی است. شایع‌ترین میکروارگانیزم ایزوله شده، اشرشیا کلی (۸۳/۵٪) بود و کلبسیلا (۵/۵٪)، پروتئوس و استافیلوکوک ساپروفیتیکوس (هر کدام حدود ۳٪) هم از گونه‌های شایع بودند. در این تحقیق حساسیت اشرشیا کلی نسبت به جنتامایسین، نالیدیکسیک اسید و سفتری زوکسیم به ترتیب ۹۸/۶٪، ۹۸٪ و ۹۴٪ بود ولی حساسیت آن به آمپی‌سیلین و کوتریموکسازول فقط ۲۷/۵ و ۴۴ درصد به دست آمد. نتیجه کشت و آنتی‌بیوگرام دلالت بر آن داشت که نالیدیکسیک اسید حساسیت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های دیگر دارد. برعکس کوتریموکسازول و آمپی‌سیلین مقاومت شدیدی در *in vitro* نشان می‌دهند [۹]. در مطالعه‌ای که در فرانسه در مورد میزان فعالیت نالیدیکسیک اسید بر روی *E.coli* جدا شده از عفونت‌های ادراری، انجام شده بود ۹۴/۶٪ ایزوله‌های *E.coli* نسبت به نالیدیکسیک اسید حساس بودند [۱۰]. این نتایج در مقایسه با مطالعه ما نشان می‌دهد که میزان مقاومت به نالیدیکسیک اسید در ایزوله‌های *E.coli* در بیماران ما به میزان قابل توجهی بالاتر از مطالعه‌ای است که در

برای این کار محصول PCR شماره یک (P1-2) جهت سکانسینگ برای بررسی موتاسیون‌ها به شرکت سیناژن سفارش داده شد.

جهت انجام MIC، ۶ رقت متوالی از آنتی‌بیوتیک نالیدیکسیک اسید به غلظت‌های ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. در مرحله بعد به هر کدام از غلظت‌های فوق، ۲۰ میکرولیتر از کشت مایع نمونه‌ها که یک شب گرمخانه‌گذاری شده بود، اضافه گردید. سپس نمونه‌ها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شد. برای به دست آوردن نتیجه دقیق‌تر برای بعضی از نمونه‌ها، از غلظت‌های ۷۰۰، ۶۰۰ و ۵۰۰ در ۶ سری لوله، رقت تهیه شد. نتایج به شکل رشد یا عدم رشد بررسی گردید و عدم رشد در غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر یا کمتر با عنوان حساس در نظر گرفته شد.

نتایج

بر روی ۱۲۱ نمونه مثبت *E.coli* که از طریق محیط کشت کروم آگار و بعضاً آزمایشات افتراقی ثابت شده بود، آنتی‌بیوگرام نسبت به نالیدیکسیک اسید (در محیط کشت مولر هینتون) انجام گرفت که از این تعداد ۵۵ مورد (۴۵/۵ درصد) حساس، ۶۳ مورد (۵۲ درصد) مقاوم و ۳ مورد (۲/۵ درصد) Intermediate بود. همچنین نتایج به دست آمده به روش PCR با نتایج حاصل از آنتی‌بیوگرام یکسان و مشابه بود. به طوری که تعداد ۵۵ مورد (۴۵/۵ درصد) حساس، ۶۳ مورد (۵۲ درصد) مقاوم و ۳ مورد (۲/۵ درصد) Intermediate بود.

همچنین نتایج حاصل از روش MIC در مقایسه با دو روش قبلی مشابه بود. به نحوی که تعداد ۵۵ مورد (۴۵/۵ درصد) حساس، ۶۳ مورد (۵۲ درصد) مقاوم و ۳ مورد (۲/۵ درصد) Intermediate بود. در جدول یک نتایج دیسک آنتی‌بیوگرام و MIC و نتایج PCR با یکدیگر مقایسه شده است. نتایج سکانسینگ همان طور که انتظار می‌رفت یکی از نمونه‌ها را به عنوان نمونه حساس بدون موتاسیون معرفی کرد ولی در مورد نمونه مقاوم پنج مورد موتاسیون در کدون

در گونه‌های E.coli جدا شده از محصولات غذایی، حیوانی و انسانی می‌شد مورد آنالیز قرار گرفت. در ۱۳ مورد نمونه حساس به نالیدیکسیک اسید هیچ تغییر اسید آمینه‌ای در پروتئین‌های ParC و gyTA مشاهده نگردید در حالی که در همه گونه‌های مقاوم به نالیدیکسیک اسید حداقل یک مورد تغییر اسید آمینه در پروتئین gyTA در کدون‌های ۸۷ یا ۸۳ دیده شد [۱۵] که با نتایج حاصل از مطالعه ما مبنی بر وجود حداقل یک موتاسیون در کدون‌های ۸۷ یا ۸۳ مطابقت داشت.

پیش‌بینی اتفاقاتی که در آینده دنیای آنتی‌بیوتیک‌ها رخ می‌دهد، دشوار است. اما دانش ما درباره راه‌های معمول گسترش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و مشاهدات اخیر مربوط به انتقال مقاومت بین باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، احتمال بروز مقاومت‌های پیش‌بینی نشده را افزایش می‌دهد. هر چند این موضوع که ترکیبات ضد میکروبی رایج امروزی برای چه مدت می‌توانند مفید واقع شوند، قابل پیش‌بینی نیست [۱۳].

بررسی و نتیجه به دست آمده در این تحقیق و مقایسه آن با تحقیقات خارجی و داخلی (حساسیت E.coli نسبت به نالیدیکسیک اسید) نشان دهنده روند فزاینده مقاومت باکتری E.Coli به داروهای رایج می‌باشد. لذا انجام آنتی‌بیوگرام و در صورت امکان MIC و PCR جهت تعیین حساسیت میکروبی قبل از تجویز دارو در جهت انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب می‌تواند در جلوگیری از مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها مفید واقع شود.

منابع

- 1- Donnenberg MS. Enterobacteriaceae. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R editor. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone 2005; 2567-2587.
- 2- Oram M, Fisher LM. 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of Escherichia coli clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35(2): 387-9.

فرانسه انجام شده است. همچنین در مطالعه دیگری که در روسیه انجام گردید میزان مقاومت ایزوله‌های E.coli در نمونه‌های ادراری نسبت به نالیدیکسیک اسید ۶/۹ درصد بود که به طور مشخص، میزان مقاومت بسیار کمتر از مطالعه ما بود [۱۱]. به نظر می‌رسد یکی از علل اساسی در افزایش مقاومت به نالیدیکسیک اسید در بیماران ما، روند رو به رشد استفاده بی‌رویه از این آنتی‌بیوتیک باشد.

در مطالعه دیگری که بر روی عفونت‌های ناشی از استفاده از سوندهای ادراری در سال ۱۳۸۳ در همدان صورت گرفته است E.coli با ۱۷ سویه (۳۴٪) بیشترین و استاف اورئوس و کلبسیلا کمترین درصد (۲٪) میزان ایزوله‌ها را به خود اختصاص داده‌اند. اشرشیا کلی و کلبسیلا بالاترین میزان مقاومت را نسبت به نالیدیکسیک اسید، جنتامایسین و نیترو فورانتوئین نشان داده‌اند [۱۲]. علاوه بر این در تحقیقی دیگر که در سال ۱۳۸۱ در دانشگاه علوم پزشکی ایران صورت گرفته است، در آنتی‌بیوگرام انجام شده مؤثرترین آنتی‌بیوتیک تزریقی آمیکاسین (۹۱/۶٪) و مؤثرترین آنتی‌بیوتیک خوراکی نالیدیکسیک اسید (۷۶/۹٪) گزارش شده است. کم‌اثرترین آنتی‌بیوتیک در این گزارش آمپی‌سیلین (۸۷/۵٪) بوده است [۱۳]؛ در حالی که در مطالعه ما فقط ۴۵/۵ درصد از نمونه‌ها به نالیدیکسیک اسید حساس بودند، این تفاوت نشان دهنده میزان بالای مقاومت E.coli به نالیدیکسیک اسید در مطالعه ما نسبت به مطالعات قبلی می‌باشد.

علاوه بر این مطالعات که همگی بر مبنای آنتی‌بیوگرام انجام شده‌اند، مطالعات دیگری نیز به روش‌های مختلف مانند تعیین MIC و روش‌های مولکولی برای تشخیص مقاومت انجام گرفته است. در یک بررسی ۸۰ مورد از گونه‌های E.coli مقاوم به نالیدیکسیک اسید با میزان MIC >256mg/L تشخیص داده شد که در گونه ۶۱ از E.coli جدا شده مقاوم به نالیدیکسیک اسید، یک تغییر اسید آمینه در پروتئین gyTA در کدون‌های ۸۳ و ۸۷ مشاهده می‌شد [۱۴]. در مطالعه حاضر نیز یکی از موتاسیون‌های موجود در نمونه E.coli مقاوم به نالیدیکسیک، موتاسیون در کدون شماره ۸۷ بود. در مطالعه دیگری موتاسیون در ژن‌های gyA و gyrB و parC که باعث مقاومت به نالیدیکسیک اسید

- 3- Qiang YZ, Qin T, Fu W, Cheng WP, Li YS, Yi G. Use of a rapid mismatch PCR method to detect *gyrA* and *parC* mutations in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49(3): 549-52.
- 4- Mutation of *gyrA* and *ParC*. *Journal of Antimicrobial chemotherapy* 2003; 1001-1005.
- 5- Academic Press Inc. (London) Ltd. Cloning and sequencing of the *E.coli gyrA*.... *Mol. Biol* 1987; 1970: 729-736.
- 6- Cullen ME. Cloning and characterization of a DNA Gyrase A Gene. *Antimicrobiol agent* 1989; June: 886-894.
- 7- Chulain MN, Murray AM, Corbett-Feeney G, Cormican M. Antimicrobial resistance in *E.coli* associated with urinary tract infection in the west of Ireland. *Ir J Med Sci* 2005; 174(4): 6-9.
- 8- Ruiz J, Gomez J, Navia MM, Ribera A, Sierra JM, Marco F, Mensa J, Vila J. High prevalence of nalidixic acid resistant, ciprofloxacin susceptible phenotype among clinical isolates of *Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 42(4): 257-61.
- ۹- پورشفیغ م ر، ریحانی ف. عفونت دستگاه ادراری مجله علوم پزشکی ۱۳۸۱؛ ۶ (۴): ۳۹-۳۰.
- 10- Lecaillon E, Blosser-Middleton R, Sahm D, Jones M. Activity of nalidixic acid and fluoroquinolones on *Escherichia coli* strains isolated from non-complicated urinary infections. *Med Mal Infect* 2004; 34(10): 450-4.
- 11- Strachounski LS, Rafalski VV. Antimicrobial susceptibility of pathogens isolated from adult patients with uncomplicated community-acquired urinary tract infections in the Russian Federation: two multicentre studies, UTIAP-1 and UTIAP-2. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28 (Suppl 1): S4-9.
- ۱۲- موسویان س م. بررسی عفونت‌های مجاری ادراری و مقاومت آنتی بیوتیکی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی همدان ۱۳۸۳؛ ۱۱ (۳۲).
- ۱۳- قاضی مقدم ب. مقاومت آنتی بیوتیکی در عوامل باکتریال جداشده از عفونت ادراری. مجله اورولوژی ایران ۱۳۸۱؛ ۹ (۳۵).
- 14- Okuda J, Hayakawa E, Nishibuchi M, Nishino T. Sequence analysis of the *gyrA* and *parC* homologues of a wild-type strain of *Vibrio parahaemolyticus* and its fluoroquinolone-resistant mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(5): 1156-62.
- 15- ME CULLEN. Cloning and characterization of a DNA Gyrase A Gene. *Antimicrobiol agent*. June 1989; pp. 886-894.
- 16- Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Ruiz-Larrea F, Torres C. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 2003 Apr; 51(4): 1001-5.